

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-304866

(43)Date of publication of application : 28.10.2003

(51)Int.Cl.

C12N 5/06  
A61L 27/00

(21)Application number : 2002-115282

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED  
INDUSTRIAL & TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 17.04.2002

(72)Inventor : SAKAI KATSUKO  
USHIDA TAKASHI  
SAKAI YASUYUKI  
TATEISHI TETSUYA

## (54) DIFFERENTIATION CONTROL OF CELL BY THREE-DIMENSIONAL AGGLUTINATE FORMATION

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To construct three-dimensional cell agglutinates in large quantities in a short time by promoting the differentiation of isolated cells while normally maintaining the phenotype of the cells, and to efficiently make an implant of tissue reconstruction type utilizing the cell agglutinates.

SOLUTION: The three-dimensional cell agglutinates are constructed by subjecting the 1st generation cultured cells of normal bone/cartilage cells or undifferentiated stem cells to suspension culture in a nonadhesive vessel under conditions of increasing cell agglutinating force. The implant is formed by utilizing the three-dimensional cell agglutinates thus constructed.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

25.08.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-304866

(P2003-304866A)

(43) 公開日 平成15年10月28日 (2003. 10. 28)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テ-マコ-ト\* (参考)

C 1 2 N 5/06

A 6 1 L 27/00

G 4 B 0 6 5

A 6 1 L 27/00

C 1 2 N 5/00

E 4 C 0 8 1

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2002-115282 (P2002-115282)

(22) 出願日 平成14年 4 月17日 (2002. 4. 17)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

(72) 発明者 酒井 克子

東京都文京区本郷 7 丁目 3 号 1 番地 東京  
大学大学院工 学系研究科機械工学専攻内

(72) 発明者 牛田 多加志

茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法  
人産業技術総 合研究所 つくばセンター  
内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 三次元凝集塊形成による細胞の分化制御

(57) 【要約】

【課題】 単離した細胞の分化を促進させて、該細胞のフェノタイプを正常に維持したまま、大量かつ短時間に三次元凝集塊を構築する。さらに、これを利用して組織再構築型のインプラントを効率的に作製する。

【解決手段】 正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で、細胞の凝集力を高めるような条件下で浮遊培養することにより、細胞の三次元凝集塊を作製する。該方法によって作製された三次元凝集塊を利用してインプラントを作製する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、細胞の三次元凝集塊を作製する方法。

【請求項2】 浮遊培養が細胞の凝集を高めるような流れの存在する系での浮遊培養である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 細胞の凝集を高めるような流れの存在する系での浮遊培養が旋回培養である、請求項2記載の方法。

【請求項4】 正常骨・軟骨細胞または未分化幹細胞が、生体から単離された細胞である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 三次元凝集塊中の細胞が、付着培養された細胞よりも分化が促進されていることを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法によって作製された三次元凝集塊を用いて、インプラントを作製する方法。

【請求項7】 正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、細胞の分化を促進させる方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、骨・軟骨細胞等の接着性動物細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、短時間で大量に、正常なフェノタイプを維持した細胞の三次元凝集塊を形成する方法に関する。さらに、該方法によって形成された三次元凝集塊を用いて、組織再構築型のインプラントを作製する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】事故、老化、あるいは疾患による骨や軟骨組織の損傷は、人間の運動機能に著しい障害をもたらす。特に、関節障害は高齢者の多くに発症し、生活への影響も大きいことから、高齢化社会を目前に控えた今日では大きな社会問題にもなっている。

【0003】元々骨や軟骨組織は再生能が低く、損傷を受けた関節等の修復には、モザイクプラスチックと呼ばれる荷重のかからない部位の軟骨組織を移植する手法や、人工関節等のインプラントによる置換・補充が必要となる。実際、我が国では年間5万個、約500億円の人工関節が体内に移植されている。しかし、従来の人工関節は、金属、セラミックス、プラスチック等により巧みに構築された構造を有するために、長期間の使用による緩みや、感染、イオン溶出等の様々な問題が生じている。

【0004】こうした問題の解決方法として、患者から採取した骨・軟骨細胞を生体外で人工的に培養して、組織再構築型のインプラントを開発する研究が世界的に試みられている。しかしながら、生体から単離した骨・軟

骨細胞を培養担体に播種して付着培養すると、病変部位のフェノタイプと同様の細胞に脱分化するために、組織再構築型の人工関節および人工軟骨等の開発は未だ成功していない。

【0005】一方、細胞のフェノタイプを病変部位に存在する脱分化型から正常な組織と同様の分化型に戻す手法として、試験管の底に細胞を遠心力で落として細胞の凝集塊を形成させるペレット培養という技術がアメリカの企業によって報告されている。しかし、この方法では、一つの試験管に対して、非常に小さな組織片（三次元凝集塊：スフェロイド）が一つしか形成できないため、これを利用して人工関節および人工軟骨等を構築することは現実的ではない。

【0006】ところで、動物細胞の多くは接着性細胞であるため、浮遊状態で長期間培養することは困難である。そのため、このような接着性細胞は、接着性担体とともに培養するか、表面の接着性を高めた容器内で付着培養することが一般的である。例えば、表面を親水化処理したポリスチレン製容器や、ポリエチレンイミンやポリリジン等の塩基性高分子、あるいはフィブロネクチン、ラミニン、各種コラーゲン、プロテオグリカン等の細胞接着性蛋白質で表面を被覆した接着性の容器内で培養する。BHK、CHO、CHL等の浮遊培養しやすい、一部の樹立培養細胞株については、物理的な攪拌によって浮遊培養する方法も知られているが、骨・軟骨細胞等の通常の接着性動物細胞を浮遊培養することは一般に困難と言われ、行われていない。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、単離した骨・軟骨細胞の分化を促進させて、該細胞のフェノタイプを正常に維持したまま、大量かつ短時間に三次元凝集塊を構築し、これを利用して組織再構築型のインプラントを提供することを目的とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究した結果、細胞の凝集力を高める環境下で、正常骨・軟骨細胞、未分化幹細胞を浮遊培養すると、細胞のフェノタイプを正常に維持したまま、大量に三次元凝集塊を形成できることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】すなわち、本発明は以下の（1）～（7）を提供するものである。

（1） 正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、細胞の三次元凝集塊を作製する方法。

（2） 浮遊培養が細胞の凝集を高めるような流れの存在する系での浮遊培養である、上記（1）記載の方法。

（3） 細胞の凝集を高めるような流れの存在する系での浮遊培養が旋回培養である、上記（2）記載の方法。

（4） 正常骨・軟骨細胞または未分化幹細胞が、生体

から単離された細胞である、上記(1)～(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) 三次元凝集塊中の細胞が、付着培養された細胞よりも分化が促進されていることを特徴とする、上記(1)～(4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) 上記(1)～(5)のいずれか1項に記載の方法によって作製された三次元凝集塊を利用して、インプラントを作製する方法。

(7) 正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、細胞の分化を促進させる方法。

【0010】

【発明の実施の形態】1. 三次元凝集塊の作製方法

本発明は、正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、短時間かつ大量に、フェノタイプが正常に維持された細胞の三次元凝集塊を作製する方法に関する。

【0011】1. 1 細胞

本発明で用いられる細胞は、正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞である。該細胞の由来は動物であれば特に限定されないが、哺乳類が好ましく、霊長類が最も好ましい。

【0012】本発明において、「正常骨・軟骨細胞」とは、組織学的かつ遺伝子学的に正常な骨細胞および軟骨細胞を意味し、疾患等により病変した骨細胞や軟骨細胞は排除される。また、骨・軟骨細胞には、骨細胞、軟骨細胞のほか、骨芽細胞、骨膜細胞、破骨細胞、および軟骨芽細胞も含まれる。

【0013】本発明において、「未分化幹細胞」とは、分化・増殖能力を有する未分化の細胞であり、たとえば、胚性幹細胞(ES細胞)、間葉系幹細胞、造血幹細胞、骨格筋幹細胞、神経幹細胞および肝臓幹細胞等を挙げることができるが、特に、胚性幹細胞および間葉系幹細胞が好ましい。これらの未分化幹細胞は初代培養細胞であることが必要である。

【0014】前記細胞は、培養細胞株ではなく、生体から単離された細胞を好適に用いることができる。なお、生体は、患者自身であってもよいし、他人であってもよいし、あるいは、異種動物であってもよい。これらの細胞は、常法に従って結合組織等を除去して調製することが好ましい。また、単離した細胞は、一次培養を行い、予め増殖させてから用いてもよい。

【0015】1. 2 非接着性の容器

本発明で用いられる培養容器は、非接着性の容器である。本発明において、「非接着性の容器」とは、細胞が付着しにくい容器であればよく、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の付着性の低いプラスチック製の容器あるいは、フッ素加工、シリコン加工のような疎水性表面加工を施したプラスチック製またはガラ

ス製の容器を挙げることができる。該容器の大きさや形状は特に限定されず、ディッシュ状、フラスコ状、ウェル状等、培養する細胞に応じて任意の形状および大きさを選択することができる。

【0016】1. 3 細胞の浮遊培養

本発明の方法では、前記非接着性の容器内において細胞を浮遊培養する。浮遊培養は静置培養であっても、静置培養でなくてもよいが、細胞の凝集力を高める条件下での培養であることが好ましい。細胞の凝集力を高める条件下での培養とは、例えば、細胞の凝集を高めるような流れのある条件下での培養をいう。

【0017】「細胞の凝集を高めるような流れのある条件下」としては、例えば、旋回流等の流れによる応力(遠心力、求心力)によって、細胞を1点に集めるようにして培養する方法を挙げることができる。本発明においては、旋回培養をその好適な例として挙げる。旋回培養を行う場合の旋回速度は、特に限定されず、容器の大きさ等によって適宜設定する。例えば、35mm程度のウェルであれば、10～1000rpm程度で十分な三次元凝集塊を形成させることができる。

【0018】前記浮遊培養で用いられる培地は、特に限定されず、培養する細胞に合わせて適宜選択することができる。例えば、MEM、 $\alpha$ -MEM、DMEM、RPM1、cRDF、ERDF、F12、MCDB131、F12/DMEM、およびWE等の公知の培地を挙げることができる。また、培地には、FBS(Sigma社製)、Antibiotic-Antimycotic(GIBCO BRL社製)等の抗生物質、TGF $\beta$ 、aFGF、bFGF等の増殖因子、BMP、インシュリン、デキサメタゾン、プロリン、ピルビン酸ナトリウム、グルコース、トランスフェリン、セリン、あるいはレチノイン酸等を適宜添加しても良い。

【0019】細胞は、前記培地に適当な播種密度で播種して培養する。播種する細胞の数(播種密度)は細胞の形態を維持して培養を効率よく行わせるため、用いる細胞や容器に応じて適宜調整することが望ましい。たとえば、軟骨細胞であれば、播種密度は $10^2 \sim 10^6$  cells/ml程度であることが望ましい。

【0020】培養条件は、用いる細胞に合わせて適宜設定するが、一般には3～10%CO<sub>2</sub>下、30～40℃、特に4～6%CO<sub>2</sub>、34～38℃の条件下で行うことが望ましい。培養期間は、目的とする三次元凝集塊が形成される時間であれば特に限定されないが、少なくとも0.5時間以上であるといよい。

【0021】1. 4 三次元凝集塊

本発明の方法に従って培養をすると、数時間で細胞の三次元凝集塊(aggregates、スフェロイド)が形成されはじめ、24時間～36時間程度で数百 $\mu$ mほどの大きな三次元凝集塊を形成させることができる。なお、本明細書中において、「三次元凝集塊」とは細胞が三次元的に

集まって形成する塊を意味する。

【0022】こうして形成される三次元凝集塊を構成する細胞は、付着培養された細胞よりも分化が促進され、正常なフェノタイプを維持する。すなわち、本発明の方法によれば、分化を促進して、正常なフェノタイプを有する細胞の三次元凝集塊を、短時間かつ大量に作製することができる。

#### 【0023】2. 細胞の分化を促進させる方法

本発明はまた、正常骨・軟骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞を非接着性の容器内で浮遊培養することにより、細胞の分化を促進させる方法を提供する。

【0024】前述したように、生体から単離した骨・軟骨細胞を培養担体に播種して付着培養すると、病変部位のフェノタイプと同様の細胞に脱分化する。しかしながら、本発明の方法によって形成された三次元凝集塊中では、細胞の分化が著しく促進される（換言すれば、脱分化が抑制される）。したがって、本発明の方法によって得られた三次元凝集塊は、組織再構築型のインプラントの作製に適している。

#### 【0025】3. インプラントの作製方法

本発明はまた、本発明の培養方法によって形成された三次元凝集塊を利用したインプラントの作製方法を提供する。本発明の方法によって形成される三次元凝集塊中では細胞の分化が促進され、正常なフェノタイプが維持される。しかも、従来になく、短時間かつ大量の三次元凝集塊を得ることができる。

【0026】したがって、本発明の培養方法を応用することにより、効率的に組織再構築型のインプラントを作製することができる。該インプラントは、本発明の方法によって形成された三次元凝集塊のみから構成されるものであってもよいし、適当な生分解性材料と組み合わせで構成されるものであってもよい。

【0027】後者の場合、用いられる生分解性材料としては、例えば、ハイドロキシアパタイト、 $\beta$ -TCP（リン酸三カルシウム）、 $\alpha$ -TCP等の多孔性セラミックス、コラーゲン、ポリ乳酸、およびポリグリコール酸、ならびにこれらの複合体等を挙げることができる。該生分解性材料は、インプラントの目的や適用部位に応じて、適宜最適なものを選べばよく、例えば、強度が必要とされる移植箇所については、ハイドロキシアパタイトが好ましく、強度が必要とされない移植箇所については、生体吸収性の $\beta$ -TCP等が好ましい。これらのインプラントの用途としては、例えば、人工軟骨、人工関節、人工骨等の骨・軟骨代替用インプラント等の整形外科領域での利用、あるいは人工歯根等の歯科用インプラント等の歯科領域で利用を挙げることができる。

【0028】また、インプラントの形態および形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、およびベースト状等、任意の形態および形状を用いることができ

る。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択され、例えば、コラーゲンゲル等のゲル基材に軟骨細胞からなる三次元凝集塊を埋包して患部に適用するインプラントも可能である。特に、生体から取り出した自己の細胞をin vitroで培養してインプラントを作製すれば、それは限りなく生体に近いインプラントとして、再生医療のための有用な材料となりうる。

#### 【0029】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1：旋回培養による軟骨組織の構築

##### 1. 旋回培養

（試験方法）ウシ正常膝関節軟骨細胞を0.2%コラーゲンゼ/Fl2培地（10%ウシ胎児血清を含む）で一晩抽出した後、組織培養用ディッシュ（ファルコン社製、625cm<sup>2</sup> スクエアディッシュ）に播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃にて付着培養した。組織培養用ディッシュに軟骨細胞が付着伸展した後、細胞の数を増やすため、さらに継代を行った。十分な数になるまで細胞を増殖させた後、トリプシンを用いて細胞を剥離回収した。

【0030】次いで、回収した軟骨細胞を1.5x10<sup>7</sup> cell/s/dishの濃度で非接着性の6-wells-プレート（コースター社製、Ultra Low Attachment Polystyrene：直径35mm、ポリスチレン製）に播種した。その後、プレートを大腸菌培養用シェイカ（TAITEC社製、NR-2）の上のせ、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下、80rpmの速度で旋回培養を行った。

【0031】（結果）旋回培養開始後12時間でプレート内に軟骨細胞の三次元凝集塊の形成が認められ（図1）、24~36時間後には数百 $\mu$ mの直径を有する大量の三次元凝集塊が形成された。

##### 【0032】2. タイプIコラーゲン遺伝子の発現

（試験方法）組織培養用ディッシュで付着（単層）培養させた軟骨細胞と、旋回培養により三次元凝集塊を形成させた軟骨細胞のRNAをそれぞれIsogen（日本ジーン）を用いて抽出し、RT-PCR法により脱分化型の軟骨細胞から分泌されることが知られているタイプIコラーゲン遺伝子の発現をみた。なお、コントロールとしてGP3DH（ハウスキーピング遺伝子）を用いた。

【0033】（結果）図2に示すよう、組織培養用のディッシュで付着培養した軟骨細胞（Monolayer）に比べて、旋回培養により三次元凝集塊を形成した軟骨細胞では、タイプIコラーゲン遺伝子の産生が著しく少なかった（図2）。このことから、旋回培養を行った三次元凝集塊中の細胞は、付着培養した細胞よりも分化が促進されていることが確認された。

#### 【0034】実施例2：非接着性プレートを利用した間葉系幹細胞の旋回培養

成牛の四肢の骨髄から、常法に従い、間葉系幹細胞を調

製した。次いで、この間葉系細胞を組織培養用ディッシュ（ファルコン社製、625cm<sup>2</sup>—スクエアディッシュ）で5%CO<sub>2</sub>、37℃にて付着培養した後、トリプシン処理して剥離回収した。回収した細胞を、1.5×10<sup>7</sup> cells/dishの濃度で非接着性の6-wells-プレート（コースター社製、Ultra Low Attachment Polystyrene：直径35mm、ポリスチレン製）に播種し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下、80rpmの速度で旋回培養を行った。

【0035】（結果）旋回培養開始後12時間でプレート内に軟骨細胞の三次元凝集塊の形成が認められ（図3）、24～36時間には100～500μm程度の直径を有する三次元凝集塊が形成された。

【0036】

【発明の効果】本発明の方法によれば、細胞の分化が促進され、フェノタイプが正常に維持された、正常骨・軟

骨細胞、または未分化幹細胞の初代培養細胞由来の三次元凝集塊を短時間で大量に形成することができる。したがって、本発明の培養方法を利用することにより、再生医療の有用なツールである組織培養型インプラントを効率的に作製することができる。

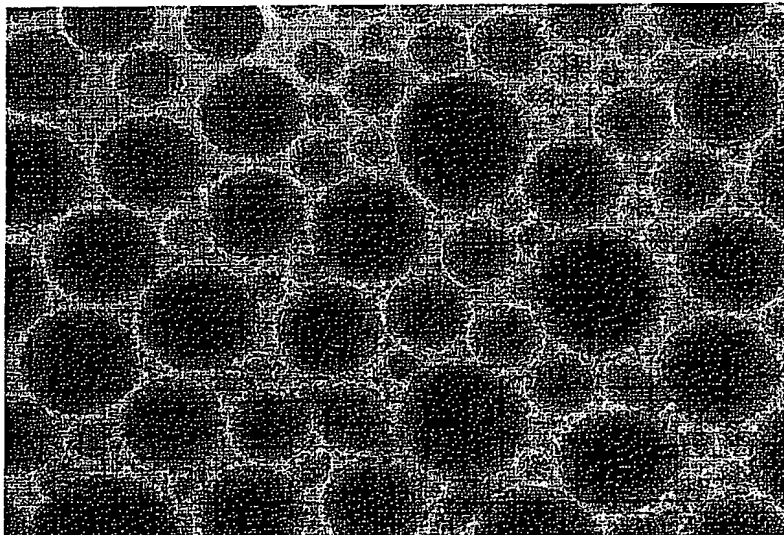
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、非接着性の容器内で旋回培養によって軟骨細胞から形成された三次元凝集塊を示す。

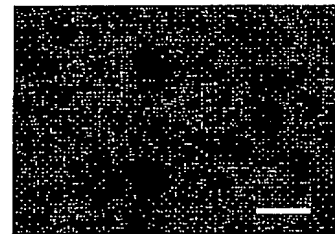
【図2】図2は、付着培養した軟骨細胞（Monolayer）と、旋回培養した軟骨細胞（Aggregates）における、タイプIコラーゲン遺伝子の発現を示す。（CN：タイプIコラーゲン遺伝子 G3PDH：ハウスキーピング遺伝子）

【図3】図3は、非接着性の容器内で旋回培養によって間葉系幹細胞から形成された三次元凝集塊を示す。

【図1】

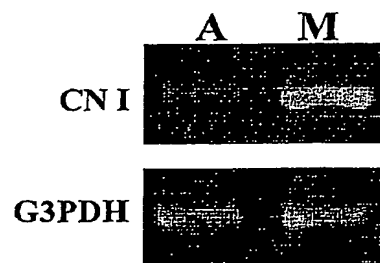


【図3】



Bar=300μm

【図2】



A: Aggregates  
M: Monolayer

フロントページの続き

(72)発明者 酒井 康行  
東京都目黒区駒場 4-6-1 東京大学生  
産技術研究所 4 部内

(72)発明者 立石 哲也  
茨城県つくば市東 1-1-1 独立行政法  
人産業技術総 合研究所 つくばセンター  
内

F ターム(参考) 4B065 AA90 AA93 AC20 BC01 BC26  
CA44  
4C081 AB04 BA13 BA14 BA15 BB08  
BC01 CD34 DA01 EA01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**